

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017598

International filing date: 26 November 2004 (26.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-399683
Filing date: 28 November 2003 (28.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 27 January 2005 (27.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP 2004/017598

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.11.2004

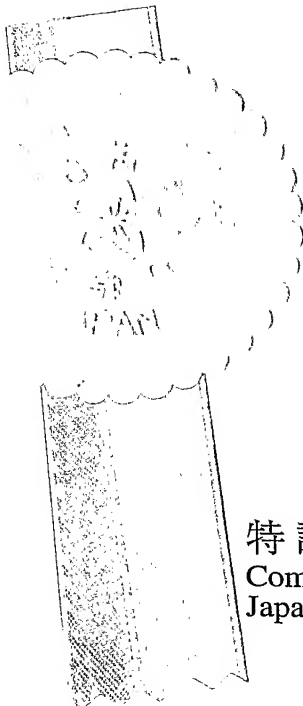
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 1 月 2 8 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 9 9 6 8 3
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 9 9 6 8 3]

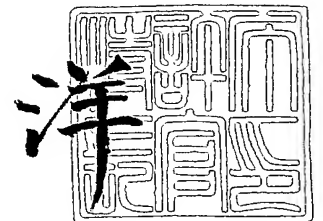
出 願 人
Applicant(s): 財団法人浜松科学技術研究振興会



特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2 0 0 5 年 1 月 1 3 日

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 2 1 4 6

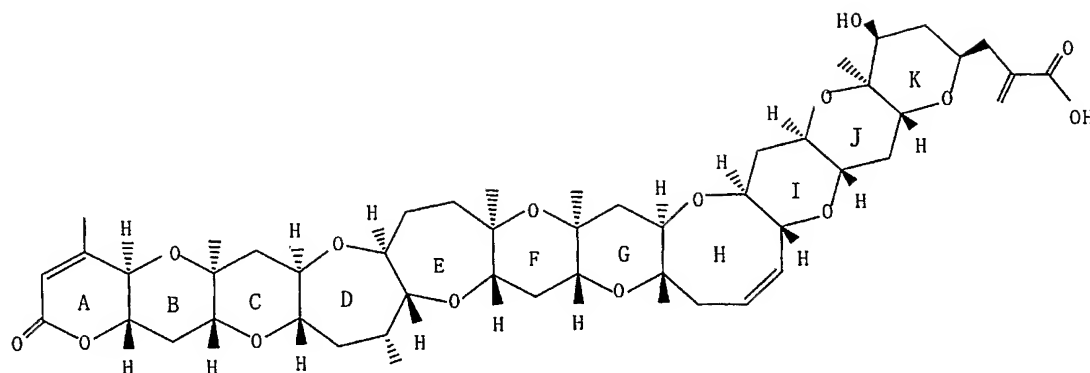
【書類名】 特許願
【整理番号】 KP-10885
【提出日】 平成15年11月28日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県静岡市瀬名 5 丁目 7 番 2 3 号
 【氏名】 石田 均司
【特許出願人】
 【識別番号】 802000020
 【氏名又は名称】 財団法人 浜松科学技術研究振興会
【代理人】
 【識別番号】 100078662
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 津国 肇
 【電話番号】 03(3502)7212
【選任した代理人】
 【識別番号】 100075225
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 篠田 文雄
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 023836
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

式 (I) :

【化 1】



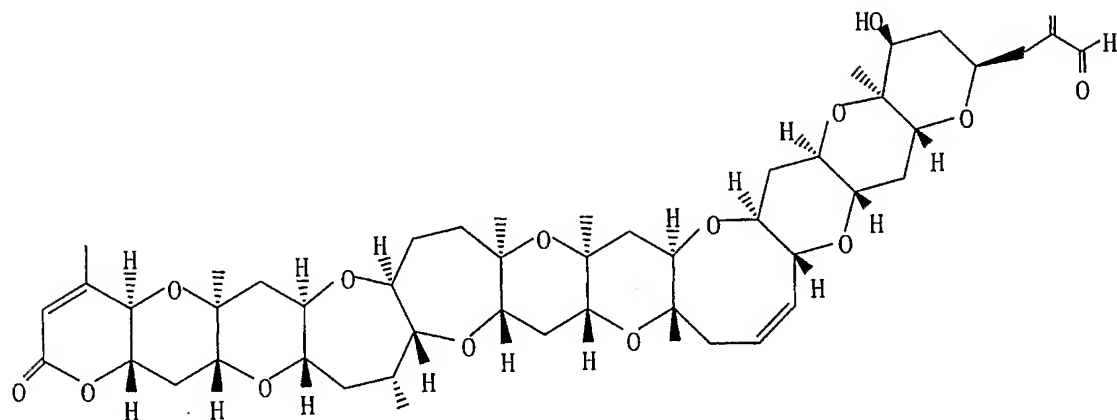
(I) BTX-B5

を有する化合物。

【請求項 2】

式 (II) :

【化 2】



(II) PbTX-2

を有する化合物の末端に位置するアルデヒド基を酸化してカルボキシ基とすることを含む、請求項 1 記載の式 (I) を有する化合物の製造方法。

【請求項 3】

貝類中に存在する請求項 1 記載の式 (I) を有する化合物を定量すること、およびこれを神経性貝毒成分のマーカーとして使用することを含む、貝類中の神経性貝毒成分の検定方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ブレベトキシン誘導体、その製造法、及びそれを用いる神経性貝毒成分の検定方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、貝類中の神経性貝毒成分、その成分の製造方法に関すると共に、その貝毒の成分を用いて神経性貝毒成分を検定する方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

ニュージーランドにおいて、1992年12月から1993年3月の間に、二枚貝の摂取による神経性貝毒による中毒が発生した。これは、渦鞭毛虫 *Gymnodinium* (G.) *breve* の赤潮にさらされた貝を摂取することにより生じる食品中毒であり、患者に特徴的な神経系症候が現れるために、神経性貝中毒 (neurotoxic shellfish poisoning: NSP) として知られている (文献1及び2)。海中の特殊なプランクトンによって生成される毒成分が貝類に取り込まれた結果、人がその貝類を採集して食した場合に神経性貝中毒などを発症するが、これまでに、これら神経性貝毒の成分として、図1に示すような、PbTx-2、PbTx-3、BTX-B1、BTX-B2、BTX-B3、BTX-B4等のブレベトキシン類が解明されてきている (文献3, 4, 5及び6)。しかし、貝類からのブレベトキシン類等の毒成分の単離は極めて困難であるために、これらの化合物の研究及び新規なブレベトキシン類等の検索は殆ど行われていない。

【非特許文献1】 McFarren EF, Silva FJ, Tanabe H, Wilson WB, Campbell JE, Lewis KH. occurrence of a ciguatera-like poison in oysters, clams, and *Gymnodinium breve* cultures. *Toxicon*. 1965 Nov;3(2):111-23.

【非特許文献2】 Morris PD, Campbell DS, Taylor TJ, Freeman JI. Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina. *Am J Public Health*. 1991 Apr;81(4):471-4.

【非特許文献3】 *Tetrahedron Letters*, Vol. 36, No. 5, pp.725-728 (1995)

【非特許文献4】 Nozawa A, Tsuji K, Ishida H. Implication of brevetoxin B1 and PbTx-3 in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand by isolation and quantitative determination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicon*. 2003 Jul;42(1):91-103.

【非特許文献5】 *MycToxin*, No.48, pp.29-31 (1999)

【非特許文献6】 Ishida H, Muramatsu N, Nukaya H, Kosuge T, Tsuji K. Study on neurotoxic shellfish poisoning involving the oyster, *Crassostrea gigas*, in New Zealand. *Toxicon*. 1996 Sep;34(9):1050-3.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

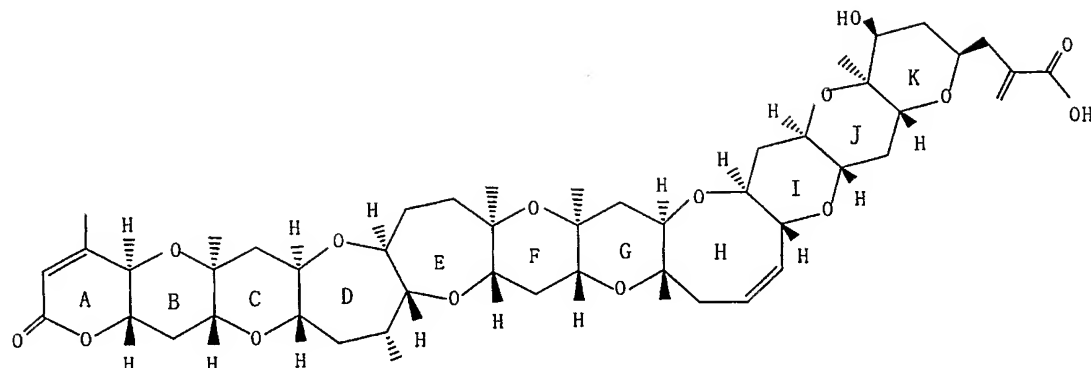
本発明は、神経性貝毒成分であるブレベトキシンの新規誘導体を提供しすることである。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明は、式 (I) :

【化 3】



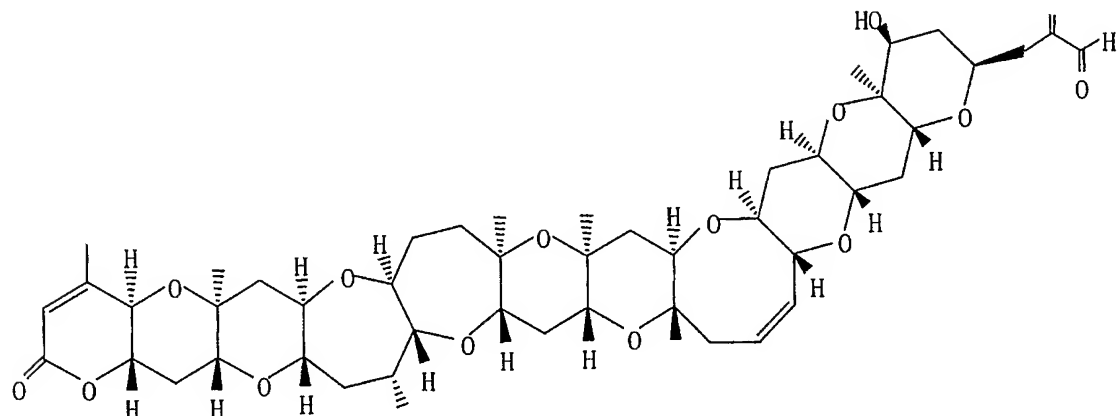
(I) BTX-B5

を有する化合物に関する。

【0005】

本発明は、式 (II) :

【化 4】



(II) PbTX-2

を有する化合物の末端に位置するアルデヒド基を酸化してカルボキシ基とすることを含む、式 (I) を有する化合物の製造方法に関する。

【0006】

さらに、本発明は、貝類中に存在する式 (I) を有する化合物を定量すること、およびこれを神経性貝毒成分のマーカーとして使用することを含む、貝類中の神経性貝毒成分の検定方法に関する。

【発明の効果】

【0007】

本発明により、他のブレベトキシン類に比べて、比較的多種類の貝類の中に良く見出され、しかも比較的安定である新規なブレベトキシン化合物（ブレベトキシン B5 (BTX-B5)）を提供でき、また、これを用いることにより貝類中の神経性貝毒成分の検定を行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の式 (I) を有する化合物は、貝類中から後述の実施例に記載のように抽出し、

単離することができる。

【0009】

本発明の式(1)の化合物は、式(II)を有する化合物の末端に位置するアルデヒド基を、例えば酸化剤を用いて、酸化してカルボキシ基とすることにより合成することもできる。式(II)を有する化合物は、PbTx-2として公知であり、例えば、文献6に記載の方法により製造できる。

【0010】

用いる酸化剤としては、アルデヒドの酸化に用いることができる酸化剤を挙げることができる。過酸化水素が好ましい。

【0011】

酸化反応は、触媒の存在下で行なうことが好ましく、触媒として、通常酸化触媒を用いることができ、SeO₂が好ましい。

【0012】

酸化反応は、以下の条件で好適に実施できる。

- ・反応温度 0～50℃(特に好ましくは 5～45℃、更に10～40℃:常温)
- ・反応圧力 0.1～10MPa(特に好ましくは0.5～5MPa:常圧)
- ・溶媒 有機極性溶媒(i-ブタノールなどの低級アルコール系有機溶媒)
- ・触媒 SeO₂などの酸化触媒
- ・酸化剤 過酸化水素などの酸化剤

【0013】

本発明の化合物(BTx-B5)は、他のプレベトキシン類に比べて、比較的多種類の貝類の中に良く見出され、しかも比較的安定であるため、貝類中に存在するBTx-B5を定量し、この量を神経性貝毒成分含量のマーカーとして、貝類中の神経性貝毒成分の検定ができる。

【実施例1】

【0014】

BTx-B5の精製、単離

【0015】

殻を剥き、凍結真空乾燥し、そして、すり潰したWhangareiからのトリガイ(160kg)を80%メタノールにより、リフラックスしながら、2回抽出した。抽出液を、CH₂Cl₂とH₂Oの間で分配した。その有機物層を、さらに、n-ヘキサンと80%メタノールの間で分配した。そのメタノール層(109.2g)を、CH₂Cl₂-MeOH-H₂O(95:5:0, 65:15:2, 65:20:3, 及び65:45:10)を用いる、SiO₂のクロマトグラフィー法分離を行って、fr-1からfr-4の4画分をそれぞれ得た。fr-1、fr-2及びfr-3は、マウス評価において神経性中毒症状を示した。マウス評価は以下のようにして行った。テスト試料のそれぞれを1% Tween 60-生理食塩水に懸濁し、18～22gのddYマウスに腹腔内注射により投与した。マウスを6時間の間は連続的に、6～15時間の間は1時間毎に観察した。マウス単位(MU)の毒性を公定法プロトコル(Delaney, J.E., 1985. Chapter 4: Bioassay procedures for shellfish toxins. In: Greenburg, Burg(Eds.). Laboratory procedures for the examination of sea water and shellfish, fifth ed, American Public Health Association Inc. Washington, DC. pp. 66-78.)において示された投与量-応答表から外挿した。BTx-B1及びPbTx-3のMUをマウス検定データに基づく3.6及び4.0 µg/MUの変換係数をそれぞれ用いて変換した。

【0016】

fr-2及びfr-3を、ODS-A₆₀(YMC-Ge1)により、70%及び80% MeOHを使用して溶出し、二つの活性な画分fr-5及びfr-6を得た。次に、fr-5をSephadex LH-20によるクロマトグラフィー法分離を行い、最後に、YMC ODS-A₃₂₄を行なってBTx-B1(12mg)を得た。

【0017】

f r-1 を、MeOH を用いる Sephadex LH-20、80% MeOH を用いる SepPak C₁₈、85% MeOH を用いる Puresil (Millipore) C₁₈、そして、最後に 80% MeOH を用いる LiChroCART RP-18 (Merck) による連続的なクロマトグラフィー法分離にかけ、更なる高純度化を行い、P b T x-3 (約 2.4 mg) を得た。

【0018】

f r-6 を、MeOH を用いる Sephadex LH-20、80% MeOH を用いる Puresil C₁₈ (×2)、そして、最後に 80% MeOH を用いる LiChroCART RP-18 での連続的なクロマトグラフィー法分離を行うことによって、更に高純度化されたブレベトシキン B5 (B T X-B5) (約 500 μg) を得た。その毒性溶出液は、マウス評価によって、検査された。

【実施例 2】

【0019】

B T X-B5 の構造解析

【0020】

実施例 1 で得られた毒性 B T X-B5 は、次に示す性状を有する無色の無定形な固体である。

・FABMS m/z ネガティブ, 909 (M-H)⁻; ポジティブ, 933 (M+Na)⁺.

・HR-FBMS, m/z 933.4645 (M+Na)⁺ (calcd for C₅₀H₇₀O₁₅, 933.4642)

【0021】

λ_{max} (KBr) での赤外吸収分析 3446, 1735, 1652, 1609, 1230, 1211 及び 865 cm⁻¹ は、分子中にヒドロキシ基及び 2 つの共役カルボキシレート及びカルボキシル官能基が存在することを示唆した。

この化合物は、P b T x-2 及び B T X-B1 と同様に、共役カルボキシレート及びカルボン酸発色基のために、end UV λ_{max} (MeOH) 205 nm (ε 27, 300) に近い吸収最高値 (吸収ピーク) を有する。

【0022】

B T X-B5 の 1D プロトン NMR (CD₃OD) スペクトルは、P b T x-2 のものと近似しているが、アルデヒドのシグナルの欠落があり、そして、側鎖のタウリン基によるシグナルの欠落を除いて B T X-B1 のものと実質的に同一である。(図 1)

【0023】

¹H-¹H COSY の測定は、B T X-B5 と B T X-B1 (2) との間で H2 から H40 のプロトンの結合状態 (connectivities)、化学的シフト (chemical shifts) 及び結合定数 (coupling constants) において、良好な同一性を示していた。このことから、B T X-B5 は、B T X-B1 のものと同様に、同じポリエステル部分及び立体化学構造を有している。

【0024】

C40-C41-C50 は、H2-40 から H2-50 の間に見られるアリル結合、並びに、H2-50 から C40 の HMBC 関係によって確認された。このように、B T X-B5 の側鎖中の C42 における官能基は、-COOH である。(図 2)。

【0025】

B T X-B5 (MeOH) は、CD スペクトルにおいて

・ネガティブ 最大 (Δε -5.78 エン-ラクトン ππ*) at 227nm および

・ポジティブ 最大 (Δε +6.88 エン-ラクトン nπ*) at 257nm

を示したが、それらは、B T X-B1 及び P b T x-2 において見出されたものと類似である。H-35 から H2-40 の間の NOEs は、その側鎖が B-配向性であることを示した。これらの結果は、B T X-B5 が、P b T x-2 と同じ絶対配置 (absolute configuration) を有することを示す。

【0026】

提案した構造式は、BTX-B5の(M-H)⁻イオン(m/z 909)の条件で行われた、衝撃的に活性化された解離(collisionally activated dissociation)のネガティブイオンFAB MS/MS実験によって、良くサポートされている。

【0027】

C37-C36及びC39-Oの間の結合開裂は、イオン111(図3)によって、証明された。他の主要なイオンは、BTX-B3において発表されているように、エーテル環における特徴的な結合開裂によって生成し、そして、提案した構造式とも一致した。

【実施例3】

【0028】

BTX-B5の合成

【0029】

PbTx-2をt-イソブチルアルコール(t-BuOH)中、室温で、SeO₂と30% H₂O₂とを用いるアルデヒド官能基の酸化することにより、100%の収率でBTX-B5を得た。すべてのデータは、BTX-B5が式(I)の構造式を選択するようなデータになっている。

【実施例4】

【0030】

BTX-B5の定量

HPLC条件: カラム、Cadenza CD-C18 (3mm×150mm、3μm); 移動相、20分間の0.1%ギ酸-アセトニトリルのグラジエント(60-80%アセトニトリル); 流速、0.2mL/min; 20μL注入。コーン電圧は、51、96、81及び55Vで設定され、衝突誘導性解離は、BTX-B1、BTX-B5、PbTx-3、及びPbTx-2に対して、それぞれ130、40、50及び20eVの衝突エネルギーで実施された。アルゴンが、衝突ガスとして使用された。

【0031】

液体クロマトグラフィータンデムマスペクトリーによってBTX-B5は、PbTx-3と共に、1993年の初期のNSPの発生時に収穫されたニュージーランドの毒性貝類トリガイ類、ムラサキイガイ Perna(P.) conalculus及びパシフィックカキの中に見出され、一方、BTX-B1の高いレベル及びより低いレベルが、トリガイ及び残りの2つで、それぞれ、確認された。(図4)

【0032】

前述のようにして単離されたBTX-B5の最小致死量(minimum lethal dose)は、マウス中で約0.3-0.5mg/kg(ip)であった。注入後直ぐに、その被検体動物は、他のプレベトキシン類によって引き起こされるものと極めて類似の神経系中毒症状を発現した。

【0033】

興味深いことには、PbTx-1、PbTx-2、及びPbTx-3のような幾つかのプレベトキシン類が渦鞭毛虫類 G. breveによっておおよそ1/7/2の割合において産生されることがよく知られているけれども、強力な魚類性毒物のPbTx-1及びPbTx-2は、トリガイ類において、有為的なレベルで見出せないが、より低い魚類性毒物又は致死性毒物のBTX-B3、BTX-B1及びBTX-B5は、約5/25/1の比率で見出される。

【0034】

BTX-B2、BTX-B3及びBTX-B4は、ニュージーランド産のムラサキイガイから単離されてきた。極めて最近、著しいレベルのPbTx-3および少量のBTX-B1が、同じムラサキイガイ中に見出された。これらのデータに基づくと、PbTx-3、BTX-B5、及びBTX-B1が、トリガイのNSP(神経系貝中毒)に関係した毒性に対応し、一方ムラサキイガイのPbTx-3並びにBTX-B2、B3及びB4、及びパシフィックカキのPbTx-3及びBTX-B5が対応することが示された。

【0035】

このように、BTX-B5およびPbTx-3は、G. breveの水の華 (algal bloom) 後の貝毒性を監視する優れたマーカーであり得る。BTX-B2、BTX-B3、及びBTX-B4は、トリガイ中に存在しないので、ブレベトキシンの代謝は、種特異的であることを示唆している。

【0036】

ブレベトキシソ類、特に、PbTx-1及びPbTx-2が、酸性及び塩基性の条件下は、いずれも不安定であることが報告されていた。

PbTx-2のアルデヒド末端基が、マイルドな条件下の選択的酸化によって、対応するカルボン酸基に容易に変換されることが新たに見出された。解毒のためにPbTx-2は全ての3つの貝類中でBTX-B5へ代謝され、BTX-B5のかかりの量はトリガイ内の酵素によってBTX-B1へ変換されることで消滅されるが、ムラサキガイ及びパシフィックカキ中の酵素によっては少量である。人体中におけるアルデヒド解毒経路と似ているので、我々の提案するトリガイ中のブレベトキシソ類の解毒経路は、人の中毒の場合の治療と密接な関係を有する。

【0037】

関連するメカニズム及び酵素は、詳細に明らかにすることが残されている。

ブレベトキシソ及びそれらの類似体に対するタンデムマススペクトロメトリー技術と連結した液体クロマトグラフィーを用いる高感度分析方法は、貝毒のモニタリング及び代謝の研究にとって重要である。

【産業上の利用可能性】

【0038】

本発明におけるブレベトキシソ類の1種であるこの新規な化合物 (BTX-B5) は、神経性貝毒の成分を定量する際に使用するマーカーとして使用することができるので、この分野における食品企業、漁業組合などでの貝毒のモニタリングに使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1はブレベトキシソ類 (PbTx s) 及びPbTx-2 (BTX-B s) の類似体の構造を示す。

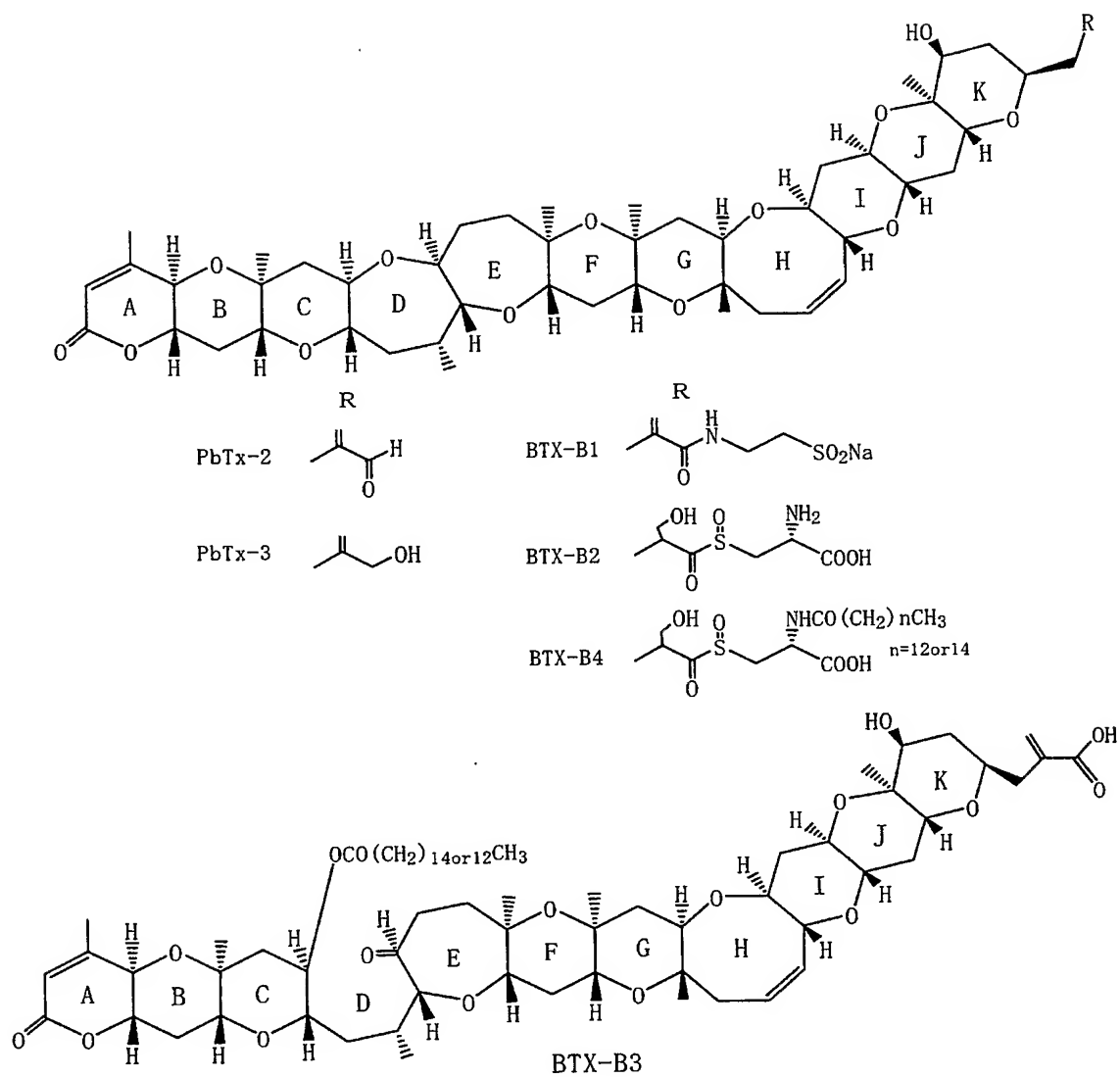
【図2】図2は、BTX-B5の(1) (a) 構造決定、並びに、(b) その炭素及び水素原子の配置、更に、(2) BTX-B1の炭素及び水素原子の化学的シフトのために使用されたNMR技術を示す。(a) 太線及び矢印は、 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY及びHMBCによって指定された部分構造をそれぞれ示す。(b) 添え字の番号は、 ^{13}C NMR (^1H NMR) 化学的シフト、 CD_3OD 中でのppmを表わし、矢印は、エーテル結合の周辺におけるNOE差異実験 (NOE difference experiments) によって測定されたNOEを示す。

【図3】図3は、前駆体として m/z 909.5での分子イオンと供のBTX-B5のネガティブFAB-CD MS/MS スペクトルを示す。

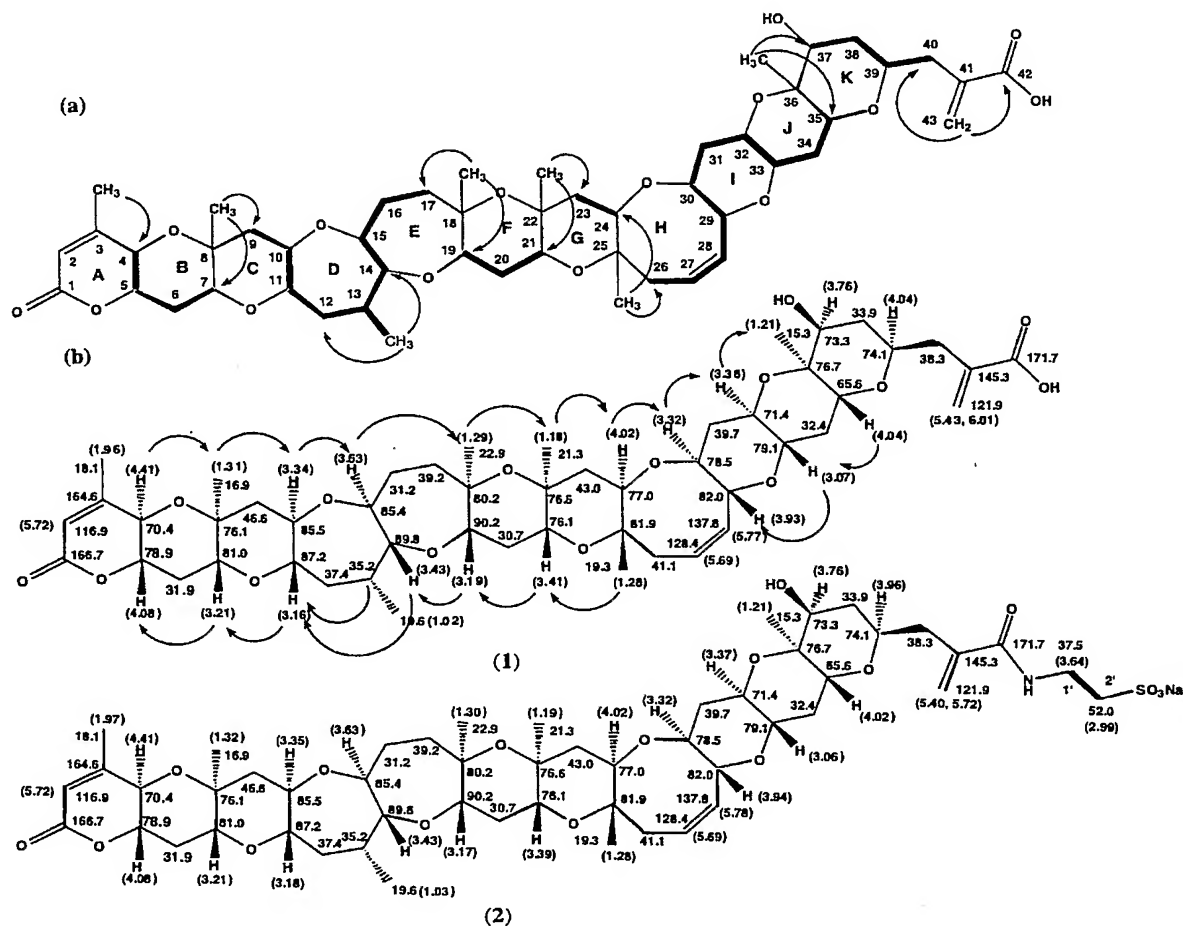
【図4】図4は、(A) 標準 (50 ng/mL) 及び毒性 (B) トリガイ、(C) ムラサキガイ及び (D) パシフィックカキ (g/mL) の80% MeOH抽出物からの80% MeOH画分の選択反応モニタリング (SRM) 液体クロマトグラフィー-タンデムマススペクトリークロマトグラム。SRM検出で使用された前駆体-産物イオンの組み合わせ及び極性が示される。

【書類名】 図面

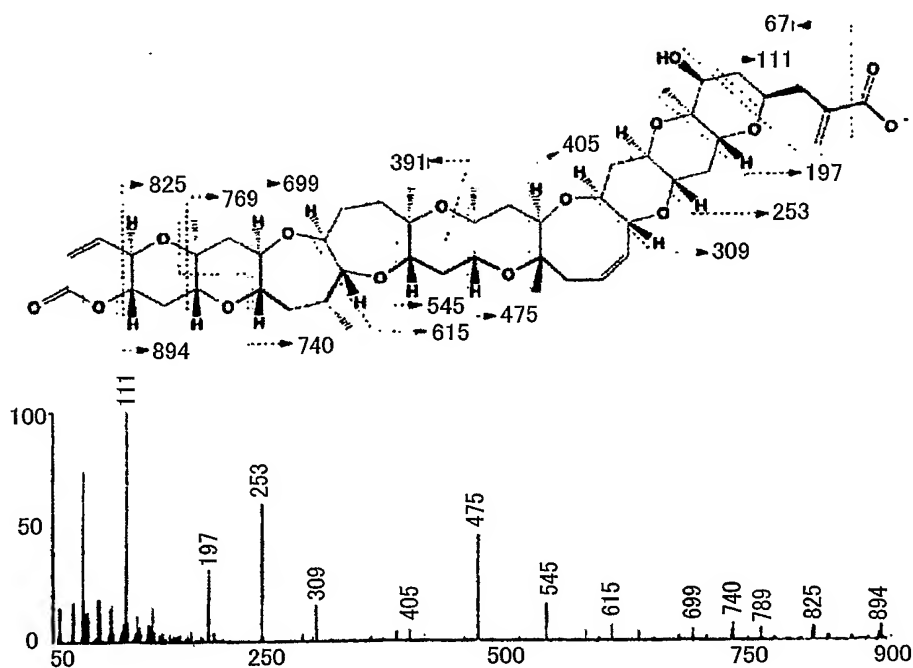
【図 1】



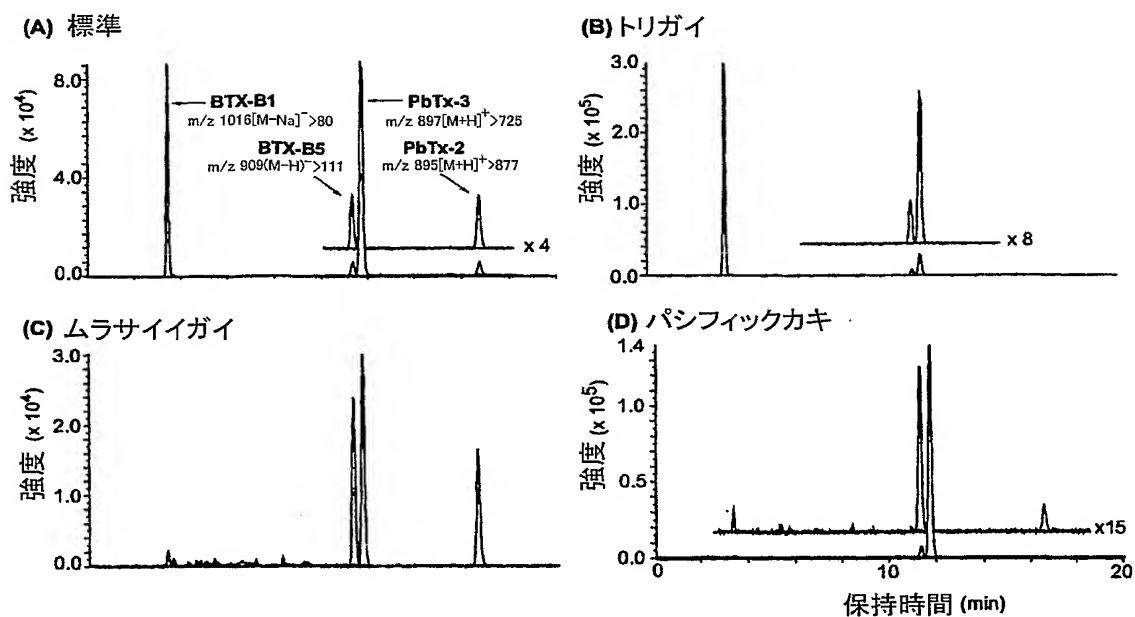
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決課題】 新規な神経性貝毒成分の提供。

【解決手段】 式（I）を有する新規な神経性貝毒成分、その成分の合成法、及びその貝毒の成分を用いて神経性貝毒の発生を調べるために、その貝毒の主な成分を検定する方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 9 9 6 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 0 2 0 0 0 0 2 0]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 1 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

静岡県浜松市城北 3 - 5 - 1 静岡大学浜松キャンパス内

氏 名

財団法人浜松科学技術研究振興会